

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15595

研究課題名(和文) 老化特異的遺伝子の機能阻害による個体老化治療の研究

研究課題名(英文) Analysis of the relationships between cellular senescence-specific genes and organismal aging

研究代表者

長野 太輝 (Nagano, Taiki)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助手

研究者番号：00759988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が独自に同定した細胞老化特異的な遺伝子の細胞老化における機能を解析することにより個体老化への関連を明らかにすることを目指して行った。PRODHおよびDAO、LY6Dの3種類の老化関連遺伝子について、老化細胞での機能を解析した結果、PRODHとDAOは活性酸素種の産生による老化促進、LY6Dは空胞形成による老化細胞の生存促進に働くことが明らかとなった。本結果は細胞老化を誘導する分子メカニズムの解明および老化細胞の特性に対する理解を促進し、今後の老化研究の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により今まで細胞老化における機能が未知であったPRODHおよびDAO、LY6Dの役割が明らかとなったことから、老化細胞の特性についての理解を推進できたと考えられる。近年、生体内に蓄積した老化細胞が個体老化や老化関連疾患を促進することが示されてきているため、老化細胞の特徴に関する知見は個体老化の理解や治療法の開発に必要であると考えられる。今後、本研究で明らかとなった遺伝子機能を調節することによる老化関連疾患の治療法や予防法の開発が可能となることも期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the relationships between cellular senescence-specific genes and organismal aging. Functional analyses of cellular senescence-specific genes (PRODH, DAO, and LY6D) that were previously identified by our group, were conducted. The results revealed that PRODH and DAO promote cellular senescence through the production of reactive oxygen species and LY6D contributes to survival of senescent cells through the formation of cytoplasmic vacuoles. These results are expected to provide a better understanding of the character of senescent cells and also be valuable in the general field of aging research.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 個体老化 活性酸素種 マクロピノサイトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昨今の少子高齢化により、老化関連疾患の根本的な治療法や予防法の開発は急務であると言える。近年、体内に蓄積した老化細胞を取り除くことで様々な老化関連疾患を改善できることが示されてきているが、生体内で起こる細胞老化を人為的に調節し、老化関連疾患の治療につなげる方法はまだ確立されていない。これは細胞老化の分子メカニズムが未だ明らかでなく、細胞老化を人為的に制御する際の適切な標的分子が見出されていないことが原因の一つである。

2. 研究の目的

本研究の目的は細胞老化制御による個体老化の治療法確立を目指して、細胞老化が誘導される分子メカニズムを明らかにすることである。申請者が独自に同定した老化細胞特異的に発現が上昇する遺伝子群に着目して、細胞老化における機能を解析することで細胞老化に至るメカニズムおよび老化細胞が持つ特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者が同定した老化特異的な遺伝子のうち、プロリン脱水素酵素 (PRODH) および D-アミノ酸酸化酵素 (DAO)、Lymphocyte Antigen 6 family member D (LY6D) の 3 遺伝子について、強制発現や発現阻害を用いて、老化細胞における機能解析を行った。また、必要に応じてそれぞれのタンパク質に特異的な活性阻害剤および関連因子や特定の細胞機能を調節する薬剤を使用した。細胞にはがん細胞および正常繊維芽細胞を用い、抗がん剤処理による DNA 損傷誘導や長期培養により細胞老化を誘導した。

4. 研究成果

下記 3 遺伝子について老化細胞における機能を解析した。

(1) プロリン脱水素酵素 (PRODH)

PRODH はミトコンドリアに局在するプロリン酸化酵素であり、酸化反応の際に副産物として活性酸素種を発生させる。活性酸素種は DNA 損傷を誘導することが知られているため、PRODH 発現上昇と細胞老化との関連を解析した結果、老化時の PRODH 発現上昇が活性酸素種の増加および DNA 損傷の亢進を介して細胞老化を促進していることが明らかとなった (図 1)。PRODH の活性阻害剤 (L-THFA) および PRODH の活性を欠損させた変異体を用いた実験から、PRODH による老化促進には PRODH の酵素活性が必要なことがわかった。以上の結果は複数の学会および *Journal of Cell Science* 誌 (*J Cell Sci.* 2017; 130: 1413-1420. doi: 10.1242/jcs.196469.) にて発表した。

(2) D-アミノ酸酸化酵素 (DAO)

DAO はペルオキシソームに局在する D-アミノ酸酸化酵素である。タンパク質を構成するアミノ酸は通常 D 体ではなく L 体であるが、近年、D-アミノ酸の生体内での機能が報告されつつある。DAO も PRODH と同様、基質の酸化反応の際に活性酸素種を発生させることが知られているため、細胞老化との関連を解析した結果、細胞老化を促進することが明らかとなった (図 2A)。ただし PRODH とは異なり、DAO の発現上昇のみでは老化誘導能はなく、DAO の補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の細胞内濃度の増加による活性上昇が老化促進に必要であることがわかった (図 2B)。さらに、FAD の前駆体であるリボフラビンの輸送体である SLC52A1 の発現を阻害すると DAO による老化促進は見られなくなった。SLC52A1 も申請者が以前に老化特異的な遺伝子として同定した因子であるため、老化時に発現上昇する遺伝子同士の相互作用も明らかになりつつあると言える。以上の結果は複数の学会および *Life Science Alliance* 誌 (*Life Sci Alliance.* 2019; 2: e201800045. doi: 10.26508/lsa.201800045.) にて発表した。

(3) Lymphocyte Antigen 6 family member D (LY6D)

細胞表面に存在する LY6D は機能未知の遺伝子である。強制発現や発現阻害による細胞老化への影響は見られなかったが、強制発現時に細胞質に顕著な空胞形成が観察された。空胞形成は老化細胞の形態的特徴であることから、LY6D と老化時の空胞との関連を解析した。その結果、空胞形成はエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスに由来するものであること、およびマクロピノサイトーシス誘導には LY6D が細胞膜の脂質ラフト上で Ras や Src と複合体を形成することが必要であることが明らかとなった。また、空胞の生理的意義を検討したところ、老化細胞が細胞外液を空胞に取り込むことによって生存を維持していることが明らかとなった (図 3)。以上の結果に関して、複数の学会で発表し、現在国際誌に

て論文改訂を行っている状況である。

以上までの結果から、本研究により申請者が同定した遺伝子群の細胞老化における機能が明らかとなり、細胞老化を誘導する分子メカニズムの解明および老化細胞が持つ特徴の理解に寄与したと考えられる。

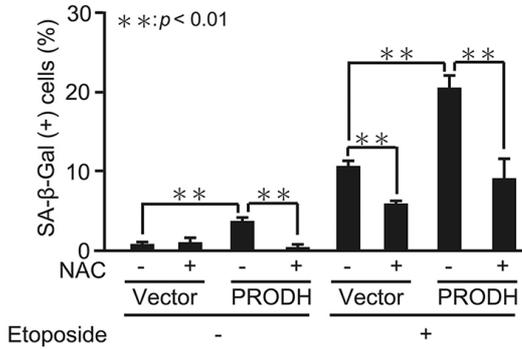


図1. PRODHは活性酸素種の産生により細胞老化を促進する

老化マーカーであるSA-β-gal染色によりPRODHと細胞老化との関連を解析した。PRODHの強制発現はDNA損傷剤であるEtoposideにより誘導された細胞老化を促進した(Bar 5とBar 7を比較)が、活性酸素種の除去剤であるNACを処理するとその効果は有意に抑制された(Bar 7とBar 8を比較)。

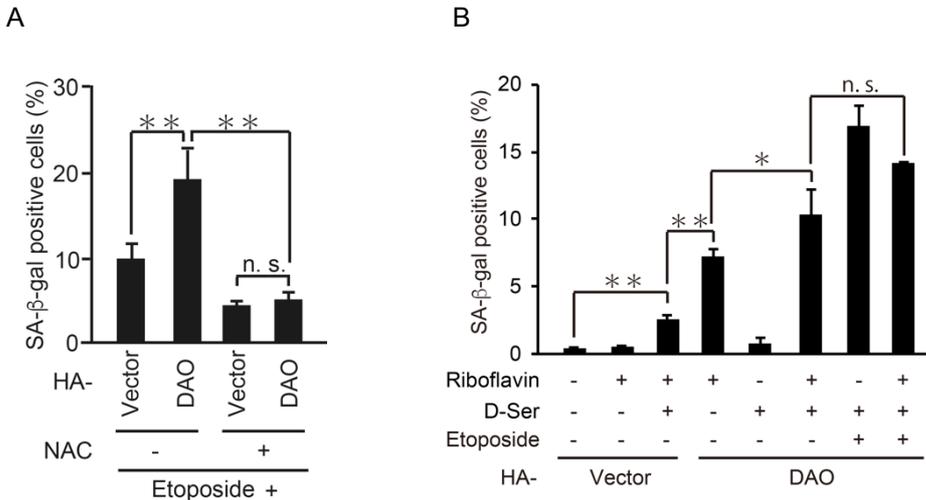


図2. DAOはリボフラビンおよび活性酸素種に依存して細胞老化を促進する

老化マーカーであるSA-β-gal染色によりDAOと細胞老化との関連を解析した。(A)DAOによる細胞老化の促進は活性酸素種の除去剤であるNAC処理により抑制された(Bar 2とBar 4を比較)。(B)DAOの強制発現のみでは細胞老化は誘導されないが、リボフラビンを培養液に添加することで老化誘導能が見られた(Bar 4とBar 5を比較)。

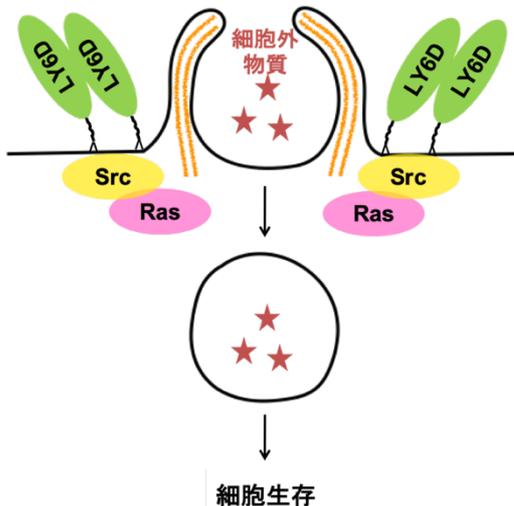


図 3. LY6D はマクロピノサイトーシスによる空胞形成を誘導し、老化細胞の生存を促進する
細胞老化を誘導する刺激に応答して発現上昇した LY6D は細胞膜の脂質ラフト上で Src や Ras と会合し、エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスを誘導する。細胞はマクロピノサイトーシスにより細胞外物質を取り込んだ空胞を形成し、中身を分解して用いることで生存を維持していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagano T, Yamao S, Terachi A, Yarimizu H, Itoh H, Katasho R, Kawai K, Nakashima A, Iwasaki T, Kikkawa U, Kamada S.	4. 巻 2
2. 論文標題 D-amino acid oxidase promotes cellular senescence via the production of reactive oxygen species.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.201800045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagano T, Nakashima A, Onishi K, Kawai K, Awai Y, Kinugasa M, Iwasaki T, Kikkawa U, Kamada S.	4. 巻 130
2. 論文標題 Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1413-1420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.196469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺地 杏樹、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 老化遺伝子EPN3の機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長野 太輝、岩崎 哲史、寺地 杏樹、麻野 翔太、片所 諒子、長井 清香、中嶋 昭雄、吉川 潮、鎌田 真司
2. 発表標題 LY6DIは老化細胞の細胞膜脂質ラフト上でSrcやRasと会合することによりマクロピノサイトーシスを誘導する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鎗水 秀虎、長野 太輝、桑葉 潮音、安房井 勇人、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 Riboflavin (Vitamin B2) transporterとして機能するSLC52A1/GPR172B の細胞老化制御機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板井 彩乃、岩崎 哲史、大西 真実、麻野 翔太、長野 太輝、鎌田 真司
2. 発表標題 自発老化メラノーマ細胞の特性解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西 真実、岩崎 哲史、麻野 翔太、福本 毅、山内 美和、板井 彩乃、坂口 正展、長野 太輝、鎌田 真司、岡 昌宏
2. 発表標題 TPAによる転移性メラノーマ増殖抑制におけるホスファターゼの機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長野 太輝、大西 健悟、岩崎 哲史、中嶋 昭雄、吉川 潮、鎌田 真司
2. 発表標題 LY6Dにより誘導されるマクロピノサイトーシスは老化細胞の生存促進に働く
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺地 杏樹, 長野 太輝, 山尾 俊介, 岩崎 哲史, 中嶋 昭雄, 吉川 潮, 鎌田 真司
2. 発表標題 新規老化関連遺伝子EPN3の機能解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大西 真実, 岩崎 哲史, 福本 毅, 山内 美和, 朱 良, 板井 彩乃, 坂口 正展, 長野 太輝, 岡 昌宏, 鎌田 真司
2. 発表標題 転移性メラノーマの増殖抑制に関するホスファターゼの機能解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tetsushi Iwasaki, Mami Onishi, Takeshi Fukumoto, Miwa Yamauchi, Zhu Liang, Ayano Itai, Masanobu Sakaguchi, Taiki Nagano, Shinji Kamada, Masahiro Oka
2. 発表標題 TPA-induced growth arrest of malignant melanoma is mediated by dephosphorylation of STAT3 through tyrosine phosphatases, PTPN11 and PTPN2
3. 学会等名 研究皮膚科学会第42回年次学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長野 太輝
2. 発表標題 新規老化遺伝子 LY6D の細胞老化における機能
3. 学会等名 第2回神戸大学若手セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 麻野翔太、井口将、長野太輝、岩崎哲史、鎌田真司
2. 発表標題 STAT3はアフリカツメガエル卵母細胞を安定化させる
3. 学会等名 第12回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野 太輝、岩崎 哲史、寺地 杏樹、麻野 翔太、片所 諒子、長井 清香、中嶋 昭雄、吉川 潮、鎌田 真司
2. 発表標題 LY6Dの多量体化は Src-Ras-PI3K経路を介してマクロピノサイトーシスを誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片所 諒子、長野 太輝、岩崎 哲史、鎌田 真司
2. 発表標題 Nectin-4は老化細胞の細胞サイズを制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

キラルアミノ酸代謝酵素の新たな機能を解明 老化の原因となる活性酸素種発生機構
http://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2019_01_22_01.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----